

08 DEC 2003



EP03/15007

REC'D 20 FEB 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 NOV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75600 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

INPI - 10000000

PROF PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951

1er dépôt



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ



Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 06 DEC 2002 LIEU INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 06 DEC. 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) BCS 02-4009		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BAYER CROPS SCIENCE S.A. Service des brevets et Licences 14-20 rue Pierre Baizet BP9163 69263 LYON Cedex 09	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date ____/____/____ Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date ____/____/____		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PLANTES LEGUMINEUSES TRANSPLASTOMIQUES FERTILES			
DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
DEMANDEUR Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite» BAYER CROPS SCIENCE S.A. SA 55 avenue René Cassin 69009 LYON FRANCE FRANÇAISE N° de téléphone (facultatif) 04.72.85.23.38 N° de télécopie (facultatif) 04.72.85.28.43 Adresse électronique (facultatif)	
Adresse Rue Code postal et ville		55 avenue René Cassin 69009 LYON	

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 5 DEC 2002 LIEU 69 INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT 0215490 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Répondu à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		BCS 02-4009	
6 MANDATAIRE			
Nom		MONCONDUIT	
Prénom		Hervé	
Cabinet ou Société		BAYER CROPSCIENCE S.A.	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		employé	
Adresse	Rue	14-20 rue Pierre Baizet BP 9163	
	Code postal et ville	69263	LYON cedex 09
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		04.72.85.23.38	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		04.72.85.28.43	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		herve.monconduit@bayercropscience.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Hervé MONCONDUIT		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

Plantes légumineuses transplastomiques fertiles

[0001] L'invention concerne la transformation des plastides de plantes, et plus précisément l'obtention de plantes légumineuses transplastomiques fertiles, en particulier de soja transplastomique fertile.

Etat de la technique

[0002] L'information génétique des plantes est distribuée dans trois compartiments cellulaires: le noyau, les mitochondries et les plastides. Chacun de ces compartiments porte son propre génome. Depuis quelques années, les plastides des végétaux supérieurs sont une cible attractive pour les manipulations génétiques. Les plastides de plantes (les chloroplastes, siège de la photosynthèse, les amyloplastides accumulant de l'amidon, élaïoplastes, étioplastes, chromoplastes accumulant des caroténoïdes, etc...) sont des centres majeurs de biosynthèse qui, outre la photosynthèse, sont responsables de la production de composés industriellement importants tels que les acides aminés, les carbohydrates, les acides gras et les pigments. Les plastides sont dérivés d'un précurseur indifférencié commun, le proplaste, et possèdent donc, dans une espèce de plante donnée, le même contenu génétique.

[0003] Le génome plastidial, ou plastome, des végétaux supérieurs est constitué d'une molécule d'ADN circulaire double brin de 120-160 kilobases, portant une large séquence répétée et inversée (environ 25 kb). Une caractéristique remarquable du génome plastidial réside dans la présence de nombreuses copies identiques de ce génome dans toutes les cellules et tous les types de plastides. Selon le stade de développement, une cellule de feuille de tabac peut contenir jusqu'à 10 000 copies de plastomes. Il est donc possible de manipuler des cellules de plantes contenant jusqu'à 20 000 copies d'un gène d'intérêt, lequel peut potentiellement résulter dans un fort niveau d'expression de gène hétérologue.

[0004] La transformation des génomes plastidiaux de plantes offre un potentiel énorme pour les biotechnologies végétales et de nombreux avantages très attractifs par rapport à la transformation conventionnelle du génome nucléaire. Le premier avantage réside dans le mécanisme même de la transformation plastidiale. En effet, l'intégration d'un transgène dans le plastome procède d'un phénomène de double recombinaison homologue. Ce processus permet de cibler précisément la région du plastome où l'on souhaite intégrer le gène d'intérêt, notamment grâce à l'utilisation de séquences plastidiales positionnées de part et d'autre du

transgène sur le vecteur de transformation. Ce ciblage précis évite l'effet dit de position, fréquemment observé dans les événements de transgénèse nucléaire.

[0005] Le deuxième avantage réside dans le nombre élevé de copies de transgènes par plaste.

5 Les cellules de plantes peuvent être manipulées de manière à contenir jusqu'à 20 000 copies d'un gène d'intérêt. Cette caractéristique permet de forts niveaux d'expression de transgènes pouvant résulter dans une accumulation de protéines transgènes allant jusqu'à 40% des protéines cellulaires totales solubles (De Cosa *et al.*, 2001, Nat. Biotechnol. 19, 71-74).

10 [0006] La nature procaryotique du plaste constitue un autre atout, notamment en permettant l'expression de gènes organisés en opérons et la traduction efficace d'ARNm polycistroniques. Cette particularité facilite l'intégration et le fonctionnement coordonné de plusieurs transgènes, tout en limitant le nombre d'étapes de transformation et le recours à de multiples marqueurs de sélection (Daniell, 1998, Nat. Biotechnol. 16, 345-8; De Cosa *et al.*, 2001, Nat. Biotechnol. 19,
15 71-74).

[0007] Un autre avantage de la transformation plastidiale par rapport à la transformation nucléaire réside dans le contrôle de la dispersion des transgènes dans l'environnement. Chez de nombreux Angiospermes, les plastes ont une hérédité maternelle stricte, et l'ADN plastidial n'est
20 pas transmis *via* le pollen. Cette particularité limite donc fortement le risque de dispersion du transgène dans l'environnement, et sa propagation potentielle à des végétaux avoisinants.

[0008] De nombreuses applications de la transformation plastidiale ont permis de confirmer les avantages de cette technologie sur la transformation nucléaire. Ainsi, la surexpression à partir du
25 plastome de tabac de gènes de tolérance à des herbicides tels que le glyphosate (Daniell, 1998, Nat. Biotechnol. 16, 345-8; WO99/10513; Ye *et al.*, 2000; WO 01/04331, WO 01/04327), ou la phosphinothricine (Basta) (Lutz *et al.*, 2001, Physiol. Plant 125, 1585-1590), confère une excellente tolérance à ces herbicides. D'autres applications ont conduit à l'obtention de plantes transplastomiques tolérantes aux insectes ou surproduisant des protéines thérapeutiques
30 (McBride *et al.*, 1995; US Patent 5,451,513; Staub *et al.*, 2000, Nat. Biotech. 18, 333-338).

[0009] Pour obtenir une transformation plastidiale, l'ADN transformant doit traverser la paroi cellulaire, la membrane plasmique et la double membrane de l'organite avant d'atteindre le stroma. A ce titre, la technique la plus couramment utilisée pour transformer le génome

plastidial est celle du bombardement de particules (Svab et Maliga, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Feb 1, 90(3): 913-7).

[0010] Actuellement, chez les végétaux supérieurs, la transformation stable des plastes est pratiquée de manière courante seulement chez le tabac, *Nicotiana tabacum* (Svab et Maliga, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526-8530; Svab et Maliga, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Feb 1, 90(3): 913-7). Bien que cette technique ait démontré son efficacité chez le tabac, sa transposition à des espèces végétales de grandes cultures semble confrontée à des obstacles techniques. Un de ces obstacles pourrait être, non pas une difficulté de transformation, mais probablement une limitation dans les systèmes de culture *in vitro* de tissus actuellement disponibles et dans les protocoles de transformation et de régénération de plantes transplastomiques. Quelques progrès récents ont néanmoins été réalisés avec la transformation des plastes de riz (Khan M.S. et Maliga, 1999, Nat. Biotechnol. 17, 910-915), d'*Arabidopsis thaliana* (Sikdar *et al*, 1998, Plant Cell Reports 18:20-24), de pomme de terre (Sidorov *et al*, 1999, Plant J. 19(2): 209-216), de *Brassica napus* (Chaudhuri *et al*, 1999) et de tomates (Ruf *et al*, 2001, Nat. Biotechnol. 19, 870-875).

[0011] Récemment, Zhang *et al*. (2001, J. Plant Biotechnol. 3, 39-44) ont décrit une technique de transformation de plastes d'une suspension cellulaire de soja à très faible fréquence. Toutefois, cette technique donne des tissus incapables de régénérer des plantes. A la connaissance des inventeurs, aucune légumineuse transplastomique fertile, et plus particulièrement aucun soja transplastomique fertile n'a été obtenu à ce jour.

[0012] De très nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Légumineuses, notamment des protéagineux comme le pois, la féverole, le haricot, le pois chiche, les lentilles, des oléo-protéagineux comme le soja et l'arachide, et des fourrages comme la luzerne ou le trèfle. Une propriété fondamentale des Légumineuses, qui est largement responsable de leur intérêt agronomique, est leur forte teneur en protéines. Cette propriété en fait des plantes de choix pour sur-exprimer des protéines d'intérêt.

[0013] Le soja, essentiellement cultivé en Amérique du Nord et Latine, ainsi qu'en Chine, est exporté en majorité vers l'Europe. Ces dernières années, des caractères de résistance à un herbicide ou aux insectes ravageurs, ont été introduits au niveau du génome nucléaire du soja. Ces manipulations génétiques au niveau du génome nucléaire de soja ont été accomplies grâce à

la technique de bombardement de particules. De nombreux génotypes ont ainsi été produits présentant une augmentation de la tolérance à des herbicides (Roundup Ready Soybean, Pagette *et al.*, 1995, Crop Sci. 35, 1451-1461) ou à des insectes ravageurs (Stewart *et al.*, 1996, Plant Physiol. 112: 121-129), ou une amélioration des traits de qualité tels que les acides gras, le phytate, les acides aminés (Soy 2000, 8th biennial Conference of the cellular and Molecular biology of the soybean, Lexington, Kentucky).

[0014] Dans ce contexte, et au vu des avantages techniques de la transformation plastidiale mentionnés plus haut, il devient crucial de mettre au point une technique fiable de transformation et de régénération de Légumineuses transplastomiques fertiles, en particulier de sojas. Ainsi, les inventeurs ont développé une méthode de transformation à haute fréquence des plastomes de soja conduisant à des plantes fertiles. Cette méthode peut aisément être adaptée à la transformation d'autres Légumineuses d'intérêt agronomique.

Description

[0015] La présente invention concerne une plante Légumineuse transplastomique fertile.

- 5 [0016] Selon la présente invention, on entend par Légumineuse une plante de la famille des *Fabaceae*. Des Légumineuses préférées selon l'invention sont les Légumineuses d'intérêt agronomique comme le pois (*Pisum sativum*), la fève (*Vicia faba major*), la féverole (*Vicia faba minor*), les lentilles (*Lens culinaris*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), le soja (*Glycine max*), l'arachide (*Arachis hypogea*), la luzerne (*Medicago sativa*), ou
- 10 le trèfle (*Trifolium sp.*)

[0017] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la Légumineuse transplastomique fertile est le soja, *Glycine max*.

- 15 [0018] Par "transplastomique", on entend selon l'invention des plantes ayant intégré de manière stable dans leur plastome au moins une cassette d'expression fonctionnelle dans les plastes. Le plastome est constitué par le génome des organites cellulaires autres que le noyau et les mitochondries. Une cassette d'expression selon l'invention comprend, entre autres éléments, au moins un promoteur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales, une séquence codant pour
- 20 une protéine d'intérêt et un terminateur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales. Ladite cassette d'expression peut contenir des éléments génétiques originaires de la plante transformée ou de tout autre organisme.

- [0019] De préférence, les plantes Légumineuses transplastomiques selon l'invention sont à l'état
- 25 d'homoplasme. L'état d'homoplasme correspond à un état selon lequel toutes les cellules contiennent une population de plastomes identiques. Selon l'invention, des plantes transplastomiques sont à l'état d'homoplasme lorsque toutes leurs cellules ne contiennent que des copies de plastomes transformés, et plus aucune copies de plastomes non-transformés. Cet état est généralement obtenu par sélection des copies de plastomes ayant intégré la cassette
- 30 d'expression, notamment grâce à l'association de ladite cassette d'expression avec un gène codant pour un marqueur de sélection. Les plastomes n'ayant pas intégré le marqueur de sélection sont alors éliminés lorsque les tissus transformés sont mis en contact avec l'agent de sélection correspondant.

[0020] Selon l'invention, les Légumineuses transplastomiques sont fertiles. Une plante fertile est une plante capable de produire une descendance viable par le biais d'un cycle de reproduction sexuée. En particulier, une plante fertile selon l'invention est une plante transplastomique capable de transmettre la cassette d'expression intégrée dans son plastome à sa descendance.

5 [0021] L'invention comprend également des vecteurs de transformation adaptés à la transformation des plastes. On entend par "vecteur adapté à la transformation des plastes", un vecteur capable d'intégrer de manière stable la (ou les) cassette(s) d'expression(s) qu'il contient dans le plastome des cellules végétales. De manière avantageuse, un vecteur adapté à la
10 transformation des plastes selon l'invention est un vecteur comprenant au moins deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer, lesdites séquences homologues encadrant au moins une cassette d'expression. Selon un mode de réalisation préféré, lesdites séquences homologues encadrent, en plus d'une cassette d'expression codant pour une protéine d'intérêt, au moins une autre cassette d'expression codant pour un marqueur de
15 sélection. Avec de tels vecteurs, l'intégration de la (ou des) cassette(s) d'expression(s) dans le plastome est réalisée par double recombinaison homologue des deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer présentes sur le vecteur avec celles correspondantes dans le plastome de la légumineuse à transformer. De manière avantageuse, les deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer permettent
20 l'intégration de la (ou des) cassette(s) d'expression(s) dans une zone intergénique du génome plastidial sans interrompre l'intégrité ni le fonctionnement des gènes plastidiaux. De manière préférée, cette zone correspond à la région de l'opéron des ARN ribosomiques du plastome.

[0022] Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les séquences homologues d'une
25 zone du plastome de la légumineuse à transformer correspondent à des séquences présentant 80% d'identité avec les séquences correspondantes dans le plastome de la légumineuse à transformer, de préférence 90% d'identité, de préférence 95%, et de préférence 99% d'identité. Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer correspondent à des séquences présentant 100%
30 d'identité avec les séquences correspondantes dans le plastome de la légumineuse à transformer.

[0023] L'invention concerne donc un vecteur adapté à la transformation des plastes, caractérisé en ce que les deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer correspondent à des séquences permettant l'intégration de la cassette d'expression

dans une région intergénique de plastome. Selon un mode de réalisation préféré, ladite zone correspond à la région de l'opéron des ARN ribosomiques du plastome.

[0024] L'invention comprend également une Légumineuse transplastomique fertile caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression insérée dans une région intergénique de plastome. Selon un mode de réalisation préféré, ladite région intergénique est sélectionnée dans la région de l'opéron des ARN ribosomiques du plastome.

[0025] Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'une des deux séquences homologues comprend les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV), et l'autre séquence homologue comprend la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7. L'invention concerne donc un vecteur adapté à la transformation des plastes, caractérisé en ce que l'une des deux séquences homologues comprend les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV), et que l'autre séquence homologue comprend la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7.

[0026] L'invention comprend donc également une Légumineuse transplastomique fertile caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression insérée dans une région intergénique de plastome, ladite région intergénique de plastome est située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7.

[0027] Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la Légumineuse à transformer est le soja. Selon ce mode de réalisation, la séquence comprenant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV) correspond à la séquence représentée par l'identificateur SEQ ID NO:1, et la séquence comprenant la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7 correspond à la séquence représentée par l'identificateur SEQ ID NO:2. L'invention concerne donc un vecteur adapté à la transformation des plastes, caractérisé en ce que la séquence homologue comprenant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV) est représentée par l'identificateur de séquences SEQ ID NO:1, et que la séquence homologue comprenant la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7 est représentée par l'identificateur de séquences SEQ ID NO:2.

[0028] Selon un mode de réalisation particulier, l'invention comprend donc un soja transplastomique fertile, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cassette d'expression insérée dans une région intergénique de plastome, ladite cassette d'expression étant insérée entre les séquences du plastome de soja correspondant aux identificateurs SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:2.

[0029] Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la séquence homologue comprenant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV) est positionnée en 5' de la cassette d'expression, et la séquence homologue comprenant la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron *rps12/7* est positionnée en 3' de la cassette d'expression.

[0030] Les vecteurs de transformation adaptés à la transformation des plastes selon l'invention comprennent au moins une cassette d'expression. Une cassette d'expression selon l'invention comprend au moins, liés entre eux de manière opérationnelle, un promoteur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales, une séquence codant pour une protéine d'intérêt et un terminateur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales. L'expression "liés entre eux de manière opérationnelle" signifie que lesdits éléments de la cassette d'expression sont liés entre eux de manière à ce que leur fonctionnement soit coordonné et permette l'expression de la séquence codante. A titre d'exemple, un promoteur est lié de manière opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'assurer l'expression de ladite séquence codante. La construction d'une cassette d'expression selon l'invention et l'assemblage de ses différents éléments est réalisable par l'emploi de techniques bien connues de l'homme du métier, notamment celles décrites dans Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Le choix des éléments régulateurs constituant la cassette d'expression est essentiellement fonction de la plante et du type de plaste dans lesquelles ils doivent fonctionner, et l'homme du métier est capable de sélectionner des éléments régulateurs fonctionnels dans une plante donnée.

[0031] Parmi les promoteurs fonctionnels dans les plastes de cellules végétales, on peut noter à titre d'exemple le promoteur du gène *psbA*, codant pour la protéine D1 du PSII (Staub et al., 1993, *EMBO Journal* 12(2): 601-606), ou le promoteur constitutif de l'opéron des ARN ribosomiaux, *Prn* (Staub et al., 1992, *Plant Cell* 4: 39-45). D'une manière générale, tout promoteur issu d'un gène de plastome de plantes conviendra, et l'homme du métier saura faire le

choix adéquat parmi les différents promoteurs disponibles de manière à obtenir un mode d'expression désiré (constitutif ou inductible). Un promoteur préféré selon l'invention comprend le promoteur *Prrn* de Tabac associé à une portion 5' de la région 5' non-traduite du gène *rbcL* de tabac (Svab et Maliga, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 913-917).

5

[0032] Parmi les terminateurs fonctionnels dans les plastes de cellules végétales, on peut noter à titre d'exemple le terminateur du gène *psbA* de tabac (Shinozaki *et al.*, 1986; Staub *et al.*, 1993). D'une manière générale, tout terminateur issu d'un gène de plastome de plantes conviendra, et l'homme du métier saura faire le choix adéquat parmi les différents terminateurs disponibles.

10

[0033] De manière avantageuse, le vecteur utilisé dans la présente invention peut contenir, en plus d'une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour une protéine d'intérêt, au moins une autre cassette d'expression comprenant une séquence codant pour un marqueur de sélection. Le marqueur de sélection permet de sélectionner les plastes et les cellules effectivement transformées, c'est-à-dire celles ayant incorporé la (ou les) cassette(s) d'expression dans leur plastome. Il permet également d'obtenir des plastes transplastomiques fertiles à l'état d'homoplasme. Parmi les séquences utilisables codant pour des marqueurs de sélection, on peut citer celles des gènes de résistance aux antibiotiques tel que, par exemple, celle du gène *aadA* codant pour une amino glycoside 3"-adényltransférase, qui confère une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine (Svab *et al.*, 1993; Staub *et al.*, 1993), ou celle du gène de l'hygromycine phosphotransférase (Gritz *et al.*, 1983, Gene 25:179-188), mais également celles des gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White *et al.*, 1990, Nucleic Acid Res. 18(4):1062) pour la tolérance au bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On peut également utiliser des séquences de gènes rapporteurs codant pour des enzymes facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des séquences de gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567, et WO 97/04103.

30

[0034] Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le gène codant pour un marqueur de sélection est le gène *aadA* codant pour une amino glycoside 3"-adényltransférase, qui confère aux cellules et aux plastes transformés une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine (Svab *et al.*, 1993; Staub *et al.*, 1993).

[0035] L'invention concerne également un procédé d'obtention de légumineuses transplastomiques fertiles. Ce procédé comprend les étapes de :

- (a) Transformation de tissus embryogènes obtenus à partir d'embryons immatures de légumineuses avec un vecteur adapté à la transformation des plastes
- (b) Sélection des tissus transformés
- (c) Régénération de plantes transplastomiques fertiles à partir des tissus transformés

[0036] Pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention, l'étape (a) de transformation doit s'effectuer sur des tissus embryogènes obtenus à partir d'embryons immatures de légumineuses. De préférence, les tissus embryogènes sont des cals ou tout autre tissu comportant des cellules ayant conservé un état de totipotence.

[0037] La transformation des tissus embryogènes peut s'effectuer par toute méthode de transformation directe (ADN nu) ou indirecte de cellules végétales. Parmi les méthodes de transformation utilisables pour obtenir des plantes transplastomiques selon l'invention, une de celles-ci consiste à mettre les cellules ou tissus des plantes à transformer en présence de polyéthylène glycol (PEG) et du vecteur de transformation (Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, Biochimie 70(4), 503-517). L'électroporation est une autre méthode qui consiste à soumettre les cellules ou tissus à transformer et les vecteurs à un champ électrique (Andreason and Evans, 1988, Biotechniques 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62). Une autre méthode consiste à injecter directement les vecteurs dans les cellules ou les tissus par micro-injection (Gordon and Ruddle, 1985, Gene 33(2), 121-136). La transformation de plastomes peut également se faire à l'aide de bactéries du genre *Agrobacterium*, de préférence par infection des cellules ou tissus desdites plantes par *A. tumefaciens* (Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6, 143-173; Shaw et al., 1983, Gene 23(3):315-330) ou *A. rhizogenes* (Bevan et Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16:357-384; Tepfer and Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28). De manière préférentielle, la transformation de cellules ou tissus végétaux par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al. (1996, Nat. Biotechnol. 14(6), 745-750). Pour la transformation des plastomes, la souche d'*Agrobacterium* utilisée doit être préalablement transformée de manière à diriger spécifiquement son ADN-T dans les plastes.

[0038] Selon un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, la méthode dite de

bombardement de particules sera utilisée. Elle consiste à bombarder les tissus embryogènes avec des particules, de préférence d'or ou de tungstène, sur lesquelles sont adsorbés les vecteurs selon l'invention (Bruce et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24), 9692-9696; Finer et al., 1992, Plant Cell Rep. 11, 232-238; Klein et al., 1992, Biotechnology 10(3), 286-291; US Patent No. 4,945,050).

[0039] Selon le présent procédé d'obtention de légumineuses transplastomiques fertiles, les tissus embryogènes sont transformés avec un vecteur adapté à la transformation des plastes, tel que décrit dans la présente invention.

[0040] Lors de l'étape (a) de transformation des tissus embryogènes, tous les tissus soumis à la technique de transformation n'intègrent pas le vecteur. L'étape (b) de sélection des tissus transformés transplastomiques s'effectue par mise en contact des tissus soumis à l'étape (a) de transformation avec l'agent de sélection correspondant au gène marqueur de sélection employé. Durant cette phase, seules les cellules ayant intégré le gène marqueur de sélection vont survivre au contact de l'agent de sélection et former des cals verts. La durée de mise en contact des tissus avec l'agent de sélection dépend du marqueur et de l'agent de sélection employés, et peut aisément être déterminée par un homme du métier. De préférence, cette durée correspond à une période allant jusqu'à la formation desdits cals verts à partir des tissus transformés.

[0041] L'étape (c) de régénération de plantes transplastomiques fertiles à partir des tissus transformés s'effectue en induisant la formation d'embryons à partir des tissus transplastomiques sélectionnés à l'étape (b). L'induction de formation d'embryon s'effectue généralement par mise en contact desdits tissus avec un milieu d'embryogenèse approprié. De tels milieux sont connus de l'homme du métier. Un milieu préféré selon l'invention est le milieu décrit dans Finer et McMullen (1991).

[0042] Une fois induits, les embryons formés sont mis à germer dans un milieu approprié. De préférence, le milieu approprié à la germination est un milieu gélosé comprenant les éléments nutritifs nécessaires à la germination. Les jeunes plantules formées sont ensuite plantées dans un substrat adapté à la croissance des plantes. Un substrat préféré est la terre, ou un mélange à base de terre.

[0043] L'invention comprend également des parties des légumineuses transplastomiques fertiles,

et la descendance de ces plantes. On entend par "parties", tout organe de ces plantes, qu'il soit aérien ou souterrain. Les organes aériens sont les tiges, les feuilles, et les fleurs comprenant les organes reproducteurs mâles et femelles. Les organes souterrains sont principalement les racines, mais ils peuvent également être des tubercules. Par "descendance", on entend
 5 principalement les graines contenant les embryons issus de la reproduction de ces plantes entre-elles. Par extension, le terme "descendance" s'applique à toutes les graines formées à chaque nouvelle génération issue de croisements dont au moins un des parents est une plante transformée selon l'invention. Une descendance peut également être obtenue par multiplication végétative desdites plantes transformées. Les graines selon l'invention peuvent être enrobées
 10 d'une composition agrochimique comprenant au moins un produit actif possédant une activité sélectionnée parmi les activités fongicide, herbicide, insecticide, nématocide, bactéricide ou virucide.

[0044] Parmi les séquences codant pour une protéine d'intérêt qui peuvent être intégrées dans les
 15 légumineuses transplastomiques selon l'invention, on peut citer les séquences codantes de gènes codant une enzyme de résistance à un herbicide, comme par exemple le gène *bar* codant pour l'enzyme PAT (White et al., NAR 18:1062, 1990) conférant une tolérance au bialaphos, le gène codant pour une enzyme EPSPS (WO 97/04103) conférant une tolérance au glyphosate, ou le gène codant pour une enzyme HPPD (WO 96/38567) conférant une tolérance aux isoxazoles. On
 20 peut également citer un gène codant pour une toxine insecticide, par exemple un gène codant pour une δ -endotoxine de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (WO 98/40490). Peuvent également être introduits dans ces plantes des gènes de résistance aux maladies, par exemple un gène codant pour l'enzyme oxalate oxydase tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 531 498 ou le brevet US 5,866,778, ou un gène codant pour un autre peptide antibactérien et/ou antifongique
 25 tels que ceux décrits dans les demandes de brevets WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053, et WO99/91089. On peut également introduire des gènes codant pour des caractères agronomiques de la plante, en particulier un gène codant pour une enzyme delta-6 désaturase tel que décrit dans les brevets US 5,552,306, US 5,614,313, et demandes de brevets WO 98/46763 et WO 98/46764, ou un gène codant pour une enzyme sérine acétyltransférase
 30 (SAT) tel que décrit dans les demandes de brevets WO 00/01833 et WO 00/36127.

[0045] Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les légumineuses transplastomiques selon l'invention peuvent être transformées avec une cassette d'expression codant pour une protéine d'intérêt pharmaceutique ou vétérinaire. A titre d'exemple, une telle

protéine peut être un anticoagulant (sérine protéase, hirudine), un interféron, l'albumine de sérum humaine. Les protéines produites par les plantes selon l'invention peuvent également être des anticorps, ou des protéines servant de base à des vaccins.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

5 Exemples

Exemple 1: Construction d'un vecteur adapté à la transformation des plastides de soja

Le plasmide pCLT312 contient une cassette d'expression hétérologue AADA-312, encadrée par deux fragments d'ADN plastidial de soja, RRHD (Région de Recombinaison Homologue Droite) et RRHG (Région de Recombinaison Homologue Gauche) permettant l'intégration ciblée dans la région de l'opéron des ARN ribosomiques du plastome de soja. Cette région d'insertion est différente de celle utilisée par Zhang *et al.* (2001). La région RRHD contient les gènes codant pour l'ARNr16S (sous le contrôle du promoteur de l'opéron des ARN ribosomiques noté *Prrn*) et l'ARNtV (SEQ ID NO:1). La région RRHG contient la région intergénique comprise entre le gène ARNtV et l'opéron *rps12/7* (SEQ ID NO:2). Aucun gène plastidial n'est interrompu après recombinaison homologue avec ces séquences.

La cassette d'expression du vecteur pCLT312 (AADA-312) contient un gène chimérique composé, de 5' en 3', du promoteur "court" de l'opéron des ARN ribosomiques de tabac (*PrrnC*, nucléotides 102 561 à 102 677 du plastome de *Nicotiana tabacum*; Shinozaki *et al.*, 1986), d'une portion 5'*rbcL* de la région 5' non traduite du gène *rbcL* de tabac (nucléotides 57 569 à 57 584 du plastome de *Nicotiana tabacum*; Shinozaki *et al.*, 1986), de la séquence codante du gène *aadA* et du terminateur 3'*psbA* de tabac (nucléotides 533 à 146 du plastome de *N. tabacum*; Shinozaki *et al.*, 1986). Le produit du gène *aadA*, une amino glycoside 3"-adényltransférase, confère la résistance à la spectinomycine et à la streptomycine aux plantes transformées au niveau de leur génome plastidial (Svab *et al.*, 1993; Staub *et al.*, 1993).

Le vecteur pCLT312 a été obtenu comme décrit ci-dessous.

Les deux fragments d'ADN plastidial de soja (constituant les régions de recombinaison homologues RRHD et RRHG) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN total de *Glycine max* (cv. Jack) (PWO DNA polymérase, Stratagene). La région RRHD a été obtenue en utilisant les oligonucléotides OSSD5 (SEQ ID NO:4) et OSSD3 (SEQ ID NO:3). L'appariement (à une température de 60°C) de ce couple d'amorce a conduit à l'amplification d'un fragment de 1800 pb. De plus, la séquence de ces amorces génère des sites de restrictions en 5' et en 3' permettant les clonages ultérieurs. La région RRHG a été amplifiée en utilisant les amorces OSSG5 (SEQ

ID NO:6) et OSSG3 (SEQ ID NO:5) conçues de manière à insérer des sites de restriction en 5' et en 3'. Au cours de cycles de réaction PCR, la température d'appariement appliquée est de 60°C. Le produit PCR obtenu, de environ 1400 pb, a une taille supérieure à celle attendue (de 1180 pb) déterminée d'après la séquence du plastome de soja publiée dans GeneBank (X07675). Le séquençage des fragments PCR de ces deux régions montre la présence d'une insertion de 217 pb dans la région RRHG. Cette région insérée, d'après la séquence analysée, ne contient aucune ORF et s'avère être une région intergénique.

Après purification sur gel d'agarose, ces deux fragments PCR, RRHG et RRHD, ont été clonés dans le vecteur pPCRscript (Stratagene) pour donner les vecteurs pCLT309 et pCLT308, respectivement. La région RRHG excisée du vecteur pCLT309 par digestion *KpnI* a été clonée dans pCLT308 digéré au préalable par cette enzyme. Dans le vecteur pCLT300 obtenu, une cassette d'expression hétérologue plastidiale de tabac a ensuite été clonée à l'aide des enzymes *XhoI* et *HindIII* pour donner le vecteur pCLT311. Cette cassette contient un gène chimérique composé, de 5' en 3', du promoteur "court" *PrrnC* de l'opéron des ARN ribosomiques de tabac d'une portion 5'*rbcL* de la région 5' non traduite du gène *rbcL* de tabac, de la séquence codante d'un gène d'intérêt et du terminateur 3'*psbA* de tabac. Le gène d'intérêt présent dans pCLT311 a été excisé par digestion avec les enzymes *NcoI* et *XbaI*, puis remplacé par le gène *aadA* libéré par ces mêmes enzymes du plasmide pCLT115. Le vecteur de transformation plastidial obtenu est nommé pCLT312.

Exemple 2: Transformation par bombardement des génomes plastidiaux de soja

La technique de transformation du soja utilisée est le bombardement de particules. Elle est appliquée sur des tissus embryogènes de soja. Des tissus embryogènes de *Glycine max* (cv. Jack) ont été obtenus (préparés en condition stériles) en deux phases: une phase d'induction, et une phase de multiplication.

Des gousses de soja sont récoltées en serre lorsque les embryons sont encore immatures (3 mm de long maximum). Elles sont décontaminées à l'eau de javel diluée et rincées à l'eau stérile. Les gousses sont ouvertes sous hotte, en conditions stériles et les embryons sont récupérés. Les deux cotylédons sont séparés et déposés face externe sur un milieu d'induction gélosé D40. Le milieu D40 est un milieu Murashige and Skoog décrit dans Murashige and Skoog (1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497). Il comprend (en mg/l): NH_4NO_3 : 1650, H_3BO_3 : 6,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 332,2; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,025; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,025; Na_2EDTA : 37,26; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27,8; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 16,9; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,25; KI : 0,83; KNO_3 : 1900; KH_2PO_4 : 170; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 8,6; de la

vitamine Gamborg B5 (Gamborg, Miller and Ojima, 1968, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 : 151-158, composée de (en mg/l) : myo-inositol: 100; acide nicotinique: 1; Pyridoxine-Hcl: 1; Thiamine-Hcl: 10), ainsi que de 40 mg/l de 2,4-D; 6% saccharose; et 0,3% gelrite, pH 7,0.

5 Ce milieu est riche en sucre et en 2,4-D, des substances nécessaires à l'induction des embryons somatiques. Les embryons sont laissés sur ce milieu durant 3 semaines à 28°C, avec une luminosité et photopériode déterminées (24°C, avec 16 heures de jour et 8 heures de nuit).

Les embryons somatiques qui se sont développés à la surface des cotylédons sont récupérés puis étalés sur du milieu D20 qui comprend essentiellement les mêmes éléments que le milieu D40, à l'exception de la concentration en 2,4D qui est de 20 mg/l et de la concentration en 10 saccharose qui est abaissée de 60 g/l à 30 g/l à pH 5,7. Cette phase d'amplification dure 2 semaines sur le milieu D20 à 28°C.

Les embryons sont ensuite régulièrement repiqués sur un milieu FNL dérivé de celui décrit par Samoylov *et al.* (1998). Le milieu FNL modifié comprend (en mg/l): Na₂EDTA: 15 37,24; FeSO₄, 7H₂O: 27,84; MgSO₄, 7H₂O: 370; MnSO₄, H₂O: 16,9; ZnSO₄, H₂O: 8,6; CuSO₄, 7H₂O: 0,025; CaCl₂, 2H₂O: 440; KI: 0,83; CoCl₂, 6H₂O: 0,025; KH₂PO₄: 170; H₃BO₃: 6,2; Na₂MoO₄, 2H₂O: 0,25; myo-inositol: 100; acide nicotinique: 1; pyridoxine-HCL: 1; thiamine-HCL: 10; (NH₄)₂SO₄: 460; KNO₃: 2820; asparagine: 670; 1% sucrose; 2,4-D: 10; 0,3% gelrite; 20 pH 5,7. Ce milieu, moins riche en sucre et 2,4-D, permet d'obtenir des cals compétents pour une transformation à très haute fréquence en 3 ou 4 repiquages réalisés tous les 15 jours environ.

Pour la transformation des plastes de soja par bombardement, les tissus embryogènes "FNL" de soja sont mis à 4°C pendant 16 à 20h. Ces cals sont ensuite déposés dans une capsule 25 métallique grillagée, puis bombardés sur leurs deux faces (recto/verso) en utilisant un canon de type "PIG" (Particule Inflow Gun) tel que décrit dans Finer *et al.* (1992, *Plant Cell Rep.* 11, 232-238). Des micro-particules d'or (particules de 0,6 µm de diamètre) sont complexées à l'ADN (vecteur pCLT312, 5 µg/ tir) en présence de CaCl₂ (0,8 à 1 M) et de spermidine (14 à 16 mM) selon les procédés décrits dans la littérature (Russel *et al.*, 1992). Les cals embryogènes de soja bombardés sont ensuite découpés en petits morceaux de 1,5 à 2 mm et transférés sur un milieu 30 FNL gélosé contenant l'agent de sélection.

Exemple 3 : Sélection des lignées transplastomiques de soja

3.1. Evaluation de la sensibilité du soja à la spectinomycine

Actuellement, seul le gène *aadA* conférant la résistance à la spectinomycine a été utilisé avec succès comme marqueur de sélection d'événements transplastomiques. Nous avons dans un premier temps vérifié la sensibilité du soja à la spectinomycine. En effet, certaines espèces végétales comme le riz sont naturellement résistantes à la spectinomycine car elles possèdent un ARNr16S muté. Dans cette optique, des cals embryogènes de soja ont été placés sur du milieu FNL suppléé en spectinomycine à une concentration de 100mg/l, 300 mg/l (dose employée dans l'art antérieur pour la sélection de la pomme de terre -Sidorov *et al.*, 1999-), 500 mg/l (dose employée dans l'art antérieur pour la sélection du tabac -Svab et Maliga, 1990; Svab *et al.*, 1993), 600 mg/l et 700 mg/l. Ces cals ont été repiqués sur le même milieu au bout de trois semaines. Pour toutes ces concentrations, les tissus commencent à blanchir au bout de deux semaines environ, ce qui montre la sensibilité naturelle du soja pour la spectinomycine.

3.2. Sélection de lignées transplastomiques

Après 2 jours sur milieu FNL, les cals embryogènes de soja bombardés avec pCLT312 (comme décrit ci-dessus) sont recoupés, puis transférés sur une gaze stérile de criblage de manière à être en contact direct avec un milieu de sélection FNL gélosé contenant 200 mg/l de spectinomycine. Les tissus sont repiqués sur ce même milieu au bout de 15 jours, puis, au bout de 15 jours supplémentaires, sur un milieu FNL gélosé contenant 300 mg/l de spectinomycine. Après 20 jours, ils sont à nouveau repiqués sur ce dernier milieu. Selon ce procédé de sélection, seuls les tissus transformés restent verts. Les premiers cals verts, résistants à la spectinomycine, apparaissent au bout de 1,5 à 2 mois. Ces transformants plastidiaux putatifs sont ensuite entretenus sur un milieu FNL suppléé de 150 mg/l de spectinomycine.

A partir de 4 bombardements (15 cals en moyenne par bombardement), onze événements résistants à la spectinomycine (200 mg/l) ont été obtenus. Les premiers transformants putatifs sont apparus au bout de 63 jours (2 mois). Ces cals ont ensuite été amplifiés en milieu SBP6 liquide (contenant de la spectinomycine 150 mg/l) pour permettre la régénération de plantes et les analyses moléculaires. Le milieu SBP6 est décrit dans Finer et Nagasawa (1988, Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) Plant Cell. Tissue and Organ Culture 15 : 125-136). Il contient les ingrédients suivants (en mg/l) : Na₂EDTA: 37,24; FeSO₄, 7H₂O: 27,84; MgSO₄, 7H₂O: 370; MnSO₄, H₂O: 16,9; ZnSO₄, H₂O: 8,6; CuSO₄, 7H₂O: 0,025; CaCl₂, 2H₂O: 440; KI: 0,83; CoCl₂, 6H₂O: 0,025; KH₂PO₄: 170;

H_3BO_3 : 6,2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,25; myo-inositol: 100; acide nicotinique: 1; pyridoxine-HCL: 1; thiamine-HCL: 10; NH_4NO_3 : 800; KNO_3 : 3000; asparagine: 670; 6% sucrose; 2,4-D: 5; pH 5,7.

Exemple 4 : Identification des lignées transplastomiques de soja et étude de l'état d'homoplasme de ces différentes lignées par Southern Blot.

L'identification des lignées transplastomiques a été réalisée par Southern Blot (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) sur des cals puis sur les plantes issues de ces cals.

L'ADN total de 10 cal des 11 cal résistants à la spectinomycine a été extrait avec un kit commercial (Qiagen: "Dneasy Plant Mini Kit"). Toutefois, toutes techniques d'extraction d'ADN connue de l'homme du métier peut être valablement employée (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) Un μg d'ADN extrait de chacun de ces 10 cal a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* (Biolabs). Cette digestion permet de générer des fragments d'intérêt de taille exploitable en Southern Blot, en particulier un fragment de 4042 pb pour les plastomes transformés, un fragment de 2667 pb pour les plastomes sauvages, et un fragment de 2452 pb pour les plastomes transformés ayant subi une recombinaison entre les deux *PrrnC* (tabac et soja). En effet, les mécanismes de recombinaison au sein du plaste étant très actifs, l'éventualité d'une recombinaison entre ces deux éléments de séquence très homologues, orientés dans le même sens, est possible.

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse avec une migration lente pendant la nuit à 55V dans un gel d'agarose 0,8% (QA Agarose TM Multipurpose , QBIOSCIENCE). Le transfert a ensuite été réalisé de manière classique (Maniatis *et al.*, 1989). Ces fragments d'ADN sont révélés par hybridation avec des sondes radioactives (marquées au ^{32}P) qui sont de deux sortes: une sonde hybridant sur le transgène *aadA* (sonde ne révélant que les transplastomes), et une sonde hybridant sur une portion de la région intergénique de l'ADN plastidial (sonde permettant de visualiser les 3 formes de plastomes, correspondant aux nucléotides 2293 à 3068 du plastome de Glycine max; Genbank X07675). Ces deux sondes ont été amplifiées par PCR (avec le couple OSSG5 -SEQ ID NO:6- et OSSG310 -SEQ ID NO:7- pour la sonde hybridant sur la région intergénique de l'ADN plastidial, et le couple OAAX3 -SEQ ID NO:8- et OAAN5 -SEQ ID NO:9- pour la sonde *aadA*), puis marquées au ^{32}P (kit Megaprime, AMERSHAM). Les deux membranes ont été lavées avec des solutions de stringence croissante (6xSSC, puis 2xSSC-0,1% SDS, et 0,1xSSC-0,1% SDS à 65°C). Après deux heures d'exposition à -80°C, avec un écran intensificateur, l'autoradiogramme a révélé la présence d'une bande attendue de 2607 pb

(correspondant au plastome transformé par *aadA*) dans chacun des 10 cals résistants à la spectinomycine testés. Tous les événements de soja tolérants à la spectinomycine testés sont donc transplastomiques. Contrairement à la transformation plastidiale de toutes les espèces obtenues à ce jour (Svab *et al.*, 1993 ; Staub *et al.*, 1993 ; Sidorov *et al.*, 1999 ; Sikdar S.R. *et al.*, 1998), aucun mutant spontané résistant à cet antibiotique, dû à des mutations spécifiques dans le gène plastidial de l'*ARNr16S* n'a été observé lors de nos expériences de transformation du soja.

De plus, neuf des dix événements sont à l'état d'homoplasme (ou au moins très proche) puisque seul le cal numéro 1 possède encore des copies de plastomes sauvages visibles en Southern Blot. Aucun événement de recombinaison entre les deux *Prrn* consécutifs (*PrrnC* de tabac et *Prrn* natif de soja), orientés en sens, n'a été détecté par cette analyse.

Exemple 5 : Régénération des plantes transplastomiques de soja

Les plantes transplastomiques de soja ont été régénérées de la manière suivante. Lorsque suffisamment de tissus sont produits en milieu FNL, ils sont ensuite convertis en embryons en employant un milieu décrit par Finer et McMullen dans : Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol. 27P : 175-182, 1991. Après 3 à 4 transferts sur ce milieu contenant 150 mg/l de spectinomycine, les embryons sont séchés à l'air dans une boîte de Petri pendant 2 jours avant germination sur un milieu Murashige et Skoog (vitamines B5) à demi force ionique (50% des quantités du milieu MS) avec 15 g/l de saccharose, 150 mg/l de spectinomycine, 7 g/l de phytagar, pH 5,7. Lorsque les jeunes plantes sont bien développées (stade 3 folioles) et enracinées, elles sont alors transférées dans un substrat à base de tourbe "jiffy pot" durant une période de 10-15 jours pour une phase d'acclimatation avant d'être transférées en serre. Les plantes sont ensuite élevées en serre avec des conditions de culture identiques à celles de soja non transplastomiques. Au cours de la floraison, le pollen est prélevé pour réaliser une pollinisation artificielle des plantes non transgéniques afin de vérifier la non-transmission du caractère de résistance à la spectinomycine par ces organes reproducteurs.

D'autre part, un contrôle de la bonne transmission de la cassette d'expression et de l'état d'homoplasme de la descendance est effectué par PCR et Southern blot. Les graines issues des différentes lignées transplastomiques ont été semées sur un milieu de type Murashige et Skoog à demi force ionique contenant 15 g/l de saccharose et 500 mg/l de spectinomycine. Toutes les graines ont germé et produit des plantes tolérantes à la spectinomycine au contraire de graines sauvages. Cette expérience démontre ainsi la stabilité et la transmission de la cassette d'expression à la descendance. De plus, toutes les plantes transplastomiques de soja obtenues

sont fertiles. Il s'agit donc du premier rapport décrivant la production d'une plante transplastomique fertile autre que le tabac et la tomate (Ruf *et al.*, 2001). En effet, d'une part tous les événements transplastomiques d'*A. thaliana* et de riz produits à ce jour étaient tous stériles (Sikdar *et al.*, 1998 ; Khan and Maliga, 1999), et d'autre part, les cellules de soja transformées
5 n'avaient jamais pu être régénérées en plantes fertiles (Zhang *et al.*, 2001).

Revendications

1- Légumineuse transplastomique fertile

5

2- Légumineuse transplastomique fertile selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit du soja

10 3- Légumineuse transplastomique fertile selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cassette d'expression insérée dans une région intergénique de plastome

15

4- Légumineuse transplastomique fertile selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite région intergénique de plastome est située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7.

5- Légumineuse transplastomique fertile selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ladite cassette d'expression est insérée entre les séquences du plastome de soja correspondant aux identificateurs SEQ ID NO:1 et SEQID NO:2.

20

6- Légumineuse transplastomique fertile selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite cassette d'expression comprend au moins, liés entre eux de manière opérationnelle, un promoteur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales, une séquence codant pour une protéine et un terminateur fonctionnel dans les plastes de cellules végétales

25

7- Vecteur de transformation adapté à la transformation des plastes de légumineuses, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer, lesdites séquences homologues encadrant au moins une cassette d'expression

30

8- Vecteur selon la revendication 7, caractérisé en ce que les deux séquences homologues d'une zone du plastome de la légumineuse à transformer correspondent à des séquences permettant l'intégration de la cassette d'expression dans une région intergénique de plastome

9- Vecteur selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que ladite zone correspond à la région de l'opéron des ARN ribosomiques du plastome

10- Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'une des deux séquences homologues comprend les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV), et que l'autre séquence homologue comprend la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7

11- Vecteur selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence homologue comprenant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV) est représentée par l'identificateur de séquences SEQ ID NO:1, et que la séquence homologue comprenant la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7 est représentée par l'identificateur de séquences SEQ ID NO:2.

12- Vecteur selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que la séquence homologue comprenant les gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr16S) et l'ARN de transfert V (ARNtV) est positionnée en 5' de la cassette d'expression, et que la séquence homologue comprenant la région intergénique située entre le gène ARNtV et l'opéron rps12/7 est positionnée en 3' de la cassette d'expression

13- Vecteur selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences homologues encadrent, en plus d'une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour une protéine d'intérêt, au moins une autre cassette d'expression comprenant une séquence codant pour un marqueur de sélection

14- Procédé d'obtention de légumineuses transplastomiques fertiles, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- (a) Transformation de tissus embryogènes obtenus à partir d'embryons immatures de légumineuses avec un vecteur adapté à la transformation des plastes
- (b) Sélection des tissus transformés
- (c) Régénération de plantes transplastomiques fertiles à partir des tissus transformés

15- Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la méthode de transformation employée est la méthode dite de bombardement de particules

16- Procédé selon l'une des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que le vecteur adapté à la transformation des plastes est un vecteur selon l'une des revendications 7 à 13

5

10

15

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> Bayer CropScience SA

<120> Plantes légumineuses transplastomiques fertiles

<130> BCS 02-4009

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1362

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 1
 gatcaatcac gatcttctaa taagaacaag aaatcttttt cgcgatcaat ccttttgtcc 60
 cattcttcaa taatcagaaa gatccttttc aatcaagttt gaattttttc gtttggaaac 120
 aggactcttc tactgcattt ttatttactt tttttttatt tctttttctc catcattcct 180
 taactcccac aaggtttggc cctgtagaat ctgaccattt tcatcattga gcgaaaagta 240
 cgaaaaaat cagatcgatt ttctgaccaa aagtactatg tgaaatcctc ggttttttcc 300
 tctttctcta tccctatctc gtaggtagag cgtttgaatc aatagagaac cctttcttct 360
 gtatctgtat gaatcgatat tattacattc caaaattcct tcccgatacc tccaaaggaa 420
 ccgaattgga tcccaaattg acgggttagt gtgagcttat ccattgcggtt atgcaccctt 480
 cgaataggaa tccattttct gaaagatccc ggctttcgtg cgttgggtggg tcttcgagat 540
 cctttcgatg acctatgttg tgttgaaggg atatctatat gaaaagacag ttctatttct 600
 attctattag tattttcgat tagtattaaa ttcgtttttag ttagtgatct cggctcagct 660
 agtcttttct ttogtgatga actgttggca cctgtcttcc attttgtctc tgtggaccga 720
 ggagaaaggg agctcagcgg caagaggatt gtaacatgar agaagcaagg aggtcaacct 780
 ttttcaaata tacaacatgg gttctggcaa tgcaatgtgg ttggactctc atgtcgatct 840
 gaatgaatca tcccttccac ggaggtaaat ctttgcttgc taggcaagag tatagcaaat 900
 taaaaattct gtcttggtag ggcattgatt ttatttacta ttaaattgaa gtagttaatg 960
 gtgggggttac cattatcctt tttgtggtaa cgaatatgtg ttcctaagaa aagcaatttg 1020

tccatttttt cggggtctcg aaggggctg gaaacacata agaactcttg aattgaaatg 1080
 gaaaaataga tgtaactcca gttacttcgg aaatggtaag atctttggcg caagaacgca 1140
 agaggagggg ttgatccgta tcatcttgac ttggttctga tttctctatt ttttaataaa 1200
 atcgagtcgg gttcttctcc taccgcgtac gaatagaaca tgcttagcca aatcttcttc 1260
 atggaaaacc tgctttatct agatcgggaa aatcatatgg ttttatgaaa tcatgtgcta 1320
 ttgctcgaat ccgtgggtcaa tcctatttcc gatagagcag tt 1362

<210> 2

<211> 1763

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 2
 gacaatggaa tccaattttt ccataatttt cgtatccgta atagtgtgaa aagaaagcct 60
 aactccaaga agttgtttta gaatagtggc gttgagtttc ttgacccttt gccttaggat 120
 tagtcagttc tatttctcga tggaggcaag ggatataact cagcggtaga gtgtcacctt 180
 gacgtgggtg aagttatcag ttcgagcctg attatcccta aaccaatgt aagtttttct 240
 atttgatgc cgtgatcgaa taataattga gaatggataa gaggctcgtg ggattacacg 300
 aggggtgggg gggctatatt tctgggagcg aactccagtc gaatatgaag cgcctggata 360
 caagttatgc cttggaatgg aagagaattc cgaatcagct ttgtctacga acaaggaagc 420
 tataagtaat gcaactagga atctcatgga gagttcgatc ctggctcagg atgaacgctg 480
 gcggcatgcc ttacacatgc aagtcggacg ggaagtgggtg tttccagtgg cggacgggtg 540
 agtaacgcgt aagaacctac ccttgggagg ggaacaacag ctggaaacgg ctgctaatac 600
 cccgtaggct gaggagcaaa aggaggaatc cgcccagga ggggctcgcg tctgattagc 660
 tagttggtga ggcaatagct taccaaggcg atgatcagta gctggtccga gaggatgatc 720
 agccacactg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggaatttt 780
 ccgcaatggg cgaaagcctg acggagcaat gccgcgtgaa ggtagaaggc ctacgggtca 840
 tgaacttctt ttcccggaga agaagcaatg acggtatccg gggaataagc atcggctaac 900
 tctgtgccag cagccgcggt aagacagagg atgcaagcgt tatccggaat gattgggcgt 960
 aaagcgtctg taggtggctt ttttaagttc cgtcaaatac ccagggtca accctggaca 1020
 ggcggtggaa actaccaagc tggagtacgg taggggcaga gggaatttcc ggtggagcgg 1080
 tgaaatgcgt agagatcgga aagaacacca acggcgaaag cactctgctg ggccgacact 1140
 gacactgaga gacgaaagct aggggagcga atgggattag ataccacagt agtcctagcc 1200
 gtaaacgatg gatactagc gctgtgcgta tcgaccgctg caatgctgta gctaacgcgt 1260
 taagtatccc gcctggggag tacgttcgca agaataaaac tcaaaggaat tgacgggggc 1320

3

ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcatgcaaa gcgaagaacc ttaccagggc	1380
ttgacatgcc gcgaatcctc tlgaaagaga ggggtgcctt cgggaacgcy gacacaggtg	1440
gtgcatggct gtcgtcagct cgtgccgtaa ggtgttggtg taagtccgc aacgagcgca	1500
accctcgtgt ttagttgcca acatttagtt tggaaccctg agcagactgc cgggtgataag	1560
ccggagggaag gtgaggatga cgtcaagtca tcatgcccct tatgccctgg gcgacacacg	1620
tgtctacaatg gacgggacaa aggatcgca tcccgcgagg gtgagctaac tccaaaaacc	1680
cgtcctcagt tcggattgta ggctgcaact cgctgcatg aagccggaat cgctagtaat	1740
cgccgggtcag ccatacggcg gtg	1763

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

ctaggagctc caccgccgta tggctgaccg	30
----------------------------------	----

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

gtcgaccatg gactagtcca ccgcggtggt ctagactcga ggacaatgga atccaatttt	60
---	----

tcc	63
-----	----

<210> 5

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

ctctccatgg gttaacaagc ttaactgctc tctcggaat aggattgacc	50
---	----

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6
ctagtgggtac cgatccaatc acgatcttct aataagaac

39

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7
gaacctcctt gcttctctca tgttacaatc ctcttgccgc

40

<210> 8

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8
ctcagtactc gagttatttg ccgactacct tggatgctc gcc

43

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 9
gaagcttcca tggcagaagc ggtgatcgcc gaag

34



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BCS 02-4009	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 15490	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PLANTES LEGUMINEUSES TRANSPLASTOMIQUES FERTILES			
LE(S) DEMANDEUR(S) : BAYER CROPS SCIENCE S.A.			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		TISSOT	
Prénoms		Ghislaine	
Adresse	Rue	8, place des hirondelles	
	Code postal et ville	69140	VANCIA
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DUFOURMANTEL	
Prénoms		Nathalie	
Adresse	Rue	29B, rue de l'oratoire	
	Code postal et ville	69300	CALUIRE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GARCON	
Prénoms		Frédéric	
Adresse	Rue	69, rue de St Cyr	
	Code postal et ville	69009	LYON
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Hervé MONCONDUIT			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

reçue le 13/01/03



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11 235*02

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		BCS 02-4009	0215480
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PLANTES LEGUMINEUSES TRANSPLASTOMIQUES FERTILES			
LE(S) DEMANDEUR(S) : BAYER CROPS SCIENCE S.A.			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		FERRULO	
Prénoms		Jean-Marc	
Adresse	Rue	3, rue Drevet	
	Code postal et ville	69002	LYON
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		PELISSIER	
Prénoms		Bernard	
Adresse	Rue	49, Chemin de Crecy	
	Code postal et ville	69370	ST DIDIER AU MONT D'OR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Hervé MONCONDUIT			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT/EP2003/015007

